

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

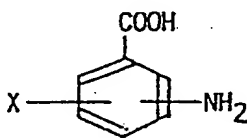
**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## 特許協力条約に基づいて国際公開された日本語特許出願

出願番号 特願平3-504017

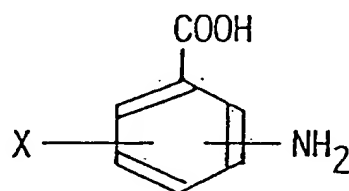
(平成4年2月6日発行)

Int.Cl.<sup>3</sup> 識別記号  
A 61 K 31/195部門(区分) 3(2)  
審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求

|  |  |
|--|--|
| A1   | (11) 国際公開番号 WO 91/11997<br>(43) 国際公開日 1991年8月22日(22.08.1991) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP91/00200<br>(22) 国際出願日 1991年2月8日(08.02.91)<br>(30) 優先権データ<br>特願平2/39241 1990年2月19日(19.02.90) JP<br>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)<br>千寿製薬株式会社<br>(SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP)<br>〒541 大阪府大阪市中央区平野町二丁目5番8号 Osaka, (JP)<br>(72) 発明者: および<br>(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)<br>井上 淳(INOUE, Jun)(JP/JP)<br>〒566 大阪府摂津市正宝4丁目13番5,7号 Osaka, (JP)<br>(81) 指定国<br>AT(欧州特許), DE(欧州特許), CA, CH(欧州特許),<br>DK(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許),<br>GB(欧州特許), GR(欧州特許), IT(欧州特許), JP, KR,<br>LU(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), SU, US.<br>添付公開書類 国際調査報告書  |  |
| (54) Title: MAILLARD REACTION INHIBITOR<br>(54) 発明の名称 マillard反応阻害剤<br><div style="text-align: center;">  <span style="float: right;">(1)</span> </div> (57) Abstract<br><p>A Maillard reaction inhibitor containing a substance represented by general formula (1), a pharmaceutically acceptable ester thereof, and a pharmaceutically acceptable salt of the substance or the ester, wherein X represents hydroxyl or nitro. It is used for treating or preventing various complications of diabetes, such as coronary artery disease, peripheral circulatory disturbance, cerebrovascular disease, neurosis, nephropathy, arteriosclerosis, atherosclerosis, cataract and retinitis, and similar diseases caused by aging, such as atherosclerosis, coronary heart disease, cerebrovascular disease, senile cataract, and so forth.</p> |  |

註 この公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

下記の一般式



〔式中、Xはヒドロキシル基又はニトロ基を表す。〕で示される物質若しくはその医薬として許容し得るエステルを、又は該物質若しくは該エステルの医薬として許容し得る塩を含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤。

本発明の製剤は種々の糖尿病合併症、例えば冠動脈性疾患、末梢循環障害、脳血管障害、神経症、腎症、動脈硬化、関節硬化症、白内障及び網膜症又は老化により引き起こされる同種の疾患例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、脳血管障害、老人性白内障等の治療又は予防に用いられる。

明 細 書

【発明の名称】

メイラード反応阻害剤

【技術分野】

本発明はメイラード反応の名で知られるブドウ糖等の還元糖によるタンパク質の劣化の防止に関し、詳しくはブドウ糖がタンパク質に非酵素的に結合して生ずるアマドリ転移生成物の生成阻害剤に関する。

【背景技術】

タンパク質がブドウ糖等の還元糖と非酵素的に反応（以下「グリコシル化」という。）して褐色化する反応はメイラードによって1912年に報告（Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 590(1912)）されて以来、食品化学の分野においてはメイラード反応の名で広く知られてきた。すなわち、貯蔵又は加熱処理を受けた食品中でタンパク質とブドウ糖とが反応して褐色化し、ついにはタンパク質分子間に交差結合が生じることによりタンパク質の変成が起こることが知られていた。その後、赤血球中においてヘモグロビンの小成分であるHb<sub>1c</sub>が糖尿病患者において増加しているとのラーバーの報告（Rahbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 296(1968)）を機に、生体内におけるブドウ糖とタンパク質との反応が注目され、Hb<sub>1c</sub>の構造の解析を通じて、メイラード反応が生体内においても起こっていることが確認されるに至った。

生体中でのメイラード反応の機構はブラウニー等によって報告されている。〔Brownlee, M. et al., Science, 232: 1629(1986)〕。即ち、先ずブドウ糖の開環構造において存するアルデヒド基が蛋白質分子中のアミノ基と反応して Schiff 塩基を形成する。このシ

ッフ塩基は不安定であるため速やかに分子内転移反応を起こして非酵素的にアマドリ転移生成物に変換される。タンパク質が長期間体内に保持された場合、アマドリ転移生成物は徐々に脱水反応を起こして新たなブドウ糖誘導体へと変換し、これがタンパク質分子等の種々の分子と不可逆的に交差結合して架橋を形成することにより、主としてタンパク質の重合体を形成する。

このような進行したグリコシル化生成物は通常 AGE (Advanced Glycosylation End product) と略称されるが、AGE の生成に伴い、タンパク質の生物学的適応性が益弱し溶解度が低下し、プロテアーゼの作用を受け難くなり、多くは黄褐色化し蛍光を発するに至る。

メイラード反応は健康人においても認められる現象であるが、血糖上昇を特徴とする糖尿病に特に顕著に認められる。また、メイラード反応は代謝回転の比較的緩徐なタンパク質において顕著であり、例えばコラーゲンや水晶体の構造タンパク質であるクリスクリン等において特に著しい。また、糖尿病においては神経障害、白内障、腎障害、網膜症、関節硬化症、アテローム性動脈硬化症等種々の合併症が認められるが、これら糖尿病合併症は老年期に多い疾病と酷似しており、正常な血糖値にあっても、ブドウ糖が代謝回転の緩徐なタンパク質をグリコシル化して徐々に AGE を形成するものと考えられている。

このような背景のもとで、生体内におけるメイラード反応を阻害する物質の探索が行われつつあり、例えば、前記ブラウニー等によりアミノグアニジンがインビトロ (in vitro) でメイラード反応を阻止すること及び同物質の投与が糖尿病ラットの動脈壁における AGE の生成を抑制する事を発表している。また特開昭6

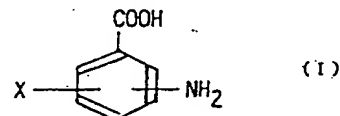
2-142114号明細書においてアミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン及びリジンがアマドリ転移生成物中の活性カルボニル基と反応してこれを封鎖し、AGE 生成を阻害することが示唆されており、特開昭64-56614号明細書において、例えばチオセミカルバジド類、1、3-ジアミノグアニジン、ベンゾイルヒドラジン等、及び特開昭64-83059号明細書において各種グアニジン誘導体がメイラード反応を抑制することが開示されている。

上記各特開昭明細書においては、メイラード反応の最終生成物である AGE の生成量を指標としてメイラード反応の阻害剤の検討を行っているが、本発明者はメイラード反応におけるタンパク質の重合の段階における直接の原因物質であるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害することにより極めて効果的なメイラード反応の阻害が期待できるとの観点から、アマドリ転移生成物の生成阻害を実験上の指標とした。タンパク質のリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基の非酵素的グリコシル化によって生成するアマドリ転移生成物である  $\epsilon$ -N-(furoyl-methyl)-L-lysine (以下「フロシン」という。) の測定値をタンパク質の非酵素的グリコシル化の指標となし得ることは、Bruggemann 等〔J. Bruggemann et al., Lebensm. Unters. Forsch., 137: p. 137-143(1968)〕および Finol 等〔P. A. Finol et al., Experientia, 24: p. 1097-1099(1968)〕によって報告されている。本発明者はブドウ糖含有タンパク質水溶液を用いてフロシンを生成させることを試み、適当な生成条件を求めて検討を重ね、それにより確立した条件に従って種々の物質のフロシン生成阻害効果の有無および強さについて検討した。その結果本発明者は、アミノ安息香酸誘導体に強力なフロシン生成阻害効果を

有するものがあることを発見し、更に検討を重ねて本発明を完成した。

【発明の開示】

すなわち本発明は、一般式 (I)



〔式中、X はヒドロキシル基又はニトロ基を表す。〕で示される物質若しくはその医薬として許容し得るエステルを、又は該物質若しくは該エステルの医薬として許容し得る塩を、含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤である。

一般式 (I) で示される物質の医薬として許容し得るエステルとしては、該物質のカルボキシル基のエステル化体である、メチルエステル、エチルエステル、n-プロピルエステル、イソプロピルエステルその他の低級アルキルエステル、又は該物質のフェノール性水酸基のエステル化体である、酢酸エステル、しょう酸エステル、マロン酸エステル、マレイン酸エステル、こはく酸エステルその他の低級カルボン酸エステル又はリン酸エステル等の無機酸のエステルが用いられる。また、一般式 (I) で示された化合物若しくはその医薬として許容し得るエステルの塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸の塩、又は酢酸、マレイン酸、等の有機酸の塩が特に適すが、これらのものに限定されず、通常、医薬と

して許容される各種の塩が用いられる。

本発明のメイラード反応阻害剤はメイラード反応を原因として生ずると考えられる後述の諸疾患の治療又は予防に用いることができる。当該目的に供する場合、本発明のメイラード反応阻害剤は経口的に又は非経口的に投与することができる。また、非経口的投与の場合には注射剤として全身的に又は例えば点眼剤等として局所的に投与することもできる。本発明のメイラード反応阻害剤の投与量は、一般式(1)で示される化合物として、経口投与の場合には通常、1日量1mg~1000mgの範囲、より好ましくは1日量5mg~200mgの範囲で、注射の場合には通常、1日量0.1mg~100mgの範囲、より好ましくは1日量1mg~5.0mgの範囲で、また点眼剤の場合には通常、0.05W/V%~5W/V%の範囲、より好ましくは0.1W/V%~2.0W/V%の範囲の液として、投与が行われるが、投与量はこれに必ずしも限定されるものではなく、疾患の種類、重症度及び治療計画等により適宜設定され得る。

本発明のメイラード反応阻害剤は、経口投与のための例えば錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤若しくはカプセル剤等、注射のための例えば水性若しくは非水性の注射用溶液剤、注射用懸濁剤若しくは注射用乳濁剤等、又は点眼のための例えば点眼液剤、もしくは点眼軟膏剤等の適宜の形態にすることができる。

本発明のメイラード反応阻害剤を経口投与用錠剤の形態とするには、例えばヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、コーンスターチ、ポリビニルピロリドン、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム等の希釈剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、纖維素グルコン酸カルシウム等の崩壊剤、グルタミン酸又はアス

パラギン酸等の溶解補助剤その他錠剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。本発明のメイラード反応阻害剤を水性注射剤とするには例えばリン酸塩等の緩衝剤、クロブクノール等の保存剤、亜硫酸ナトリウム等の安定化剤、塩化ナトリウム等の等張化剤その他注射剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。本発明のメイラード反応阻害剤を点眼剤の形態とするには、例えば、リン酸塩、ほう酸塩、酢酸塩又はクエン酸等の緩衝剤、クロブクノール、メチルパラベン、プロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム又はクロルヘキシジンジグルコネート等の保存剤、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム又はエデト酸二ナトリウム等の安定化剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトール、ノルビトール又はグリセリン等の等張化剤、ポリソルベート80、シクロデキストリン等の溶解補助剤、その他点眼剤の製造に通常使用される成分を加えることができる。

#### (実施例)

本発明のメイラード反応阻害剤の効果は次の被験物質について下記の通りの実験により確認した。これらの被験物質はいずれも既知物質であり市販のものを購入して使用した。

- AB-1: 5-ヒドロキシアントラニル酸
- AB-2: 3-ヒドロキシアントラニル酸
- AB-3: 4-ニトロアントラニル酸
- AB-4: 5-アミノサリチル酸
- AB-5: 4-アミノサリチル酸
- AB-6: 3-アミノサリチル酸
- AB-7: 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸

#### (実験方法)

次の表1に示すとおり、AB-1~AB-7の各被験物質において、メイラード反応の公知の阻害剤たるアミノグアニジンに較べて、それぞれ著しく強い阻害効果が認められた。

表1

| 被験物質     | 阻害率(%) |
|----------|--------|
| AB-1     | 94.1   |
| AB-2     | 69.4   |
| AB-3     | 47.6   |
| AB-4     | 50.7   |
| AB-5     | 70.0   |
| AB-6     | 53.4   |
| AB-7     | 60.4   |
| アミノグアニジン | 8.0    |

【発明を実施するための最良の形態】

#### 【実施例】

本発明のメイラード反応阻害剤の製剤実施例を示す。但し、成

牛血清アルブミン(No. A-8022・シグマ社)(以下「BSA」と略記する。)及びPH7.3の50mMリン酸緩衝液及び表1に示す各被験物質及びアミノグアニジンを用いて下記の通りのサンプル溶液を無菌的に調製し、37°Cで4週間保存し、非酵素的グリコシル化の進行に伴って生成するフロシンをSchleicher等の方法[E. Schleicher et al., J. Clin. Biochem., 1979, p. 81-87(1981)]に準じて高速液体クロマトグラフィーにより定量した。すなわち、反応後のサンプルを透析後、各1mlを凍結乾燥し、6N塩酸1mlを加えて100°Cで20時間加水分解を行い、塩酸を留去した後、水1mlを加えて0.45µmのフィルターにて濾過し、高速液体クロマトグラフィー用の試料とした。カラムにはODS-120T(東ソー)を、溶離液には7mMのリン酸溶液を用い、検出波長280nm及び254nmにての吸収ピークの比が3.9:1であるピークをフロシンのピークとした。

(リン酸緩衝液中の組成)

(正常群): BSA 20mg/ml

(対照群): BSA 20mg/ml + ブドウ糖 50mM

(被験群): BSA 20mg/ml + ブドウ糖 50mM +  
被験物質 5mM

各群のサンプルのフロシン定量結果により、次の式を用いて各被験物質のフロシン生成阻害率を算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = (c - d) + (c - n) \times 100$$

但し、c: 対照群のフロシンのピーク面積

d: 被験群のフロシンのピーク面積

n: 正常群のフロシンのピーク面積

(結果)

分記載における略号は実施例の部に記載の各化合物を示す。

(実施例1) 内服錠

下記成分を1錠分として常法により製造する。

必要に応じ糖衣を施す。

|              |       |
|--------------|-------|
| AB-1         | 100mg |
| 乳糖           | 80mg  |
| コーンスクーチ      | 17mg  |
| ステアリン酸マグネシウム | 3mg   |

(実施例2) 内服錠

下記成分を1錠分として常法により製造する。

必要に応じ糖衣を施す。

|              |      |
|--------------|------|
| AB-2         | 50mg |
| コーンスクーチ      | 90mg |
| 乳糖           | 30mg |
| ヒドロキシベンゾ酸    | 25mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 5mg  |

(実施例3) カプセル剤

下記成分を常法に従って混和し、顆粒状としたものをカプセルに各1個100mg充填する。

|              |       |
|--------------|-------|
| AB-3         | 10mg  |
| コーンスクーチ      | 45mg  |
| 乳糖           | 20mg  |
| 結晶セルロース      | 24mg  |
| タルク          | 0.5mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 0.5mg |

(実施例4) 注射剤

下記成分を常法により混合して溶液とし、滅菌した後バイアルに充填しオートクレーブにて滅菌して製する。

|          |       |
|----------|-------|
| AB-4     | 20mg  |
| クロロブタノール | 5mg   |
| 注射用水     | 全 1ml |

(実施例5) 点眼剤

下記の成分を常法により混合して溶液とし、滅菌減菌して製する。

|            |            |
|------------|------------|
| AB-5       | 0.5g       |
| ほう酸        | 10g        |
| ほう砂        | 適量 (PH7.0) |
| 塩化ナトリウム    | 0.25g      |
| エデト酸二ナトリウム | 0.02g      |
| クロロブタノール   | 0.2g       |
| ポリソルベート80  | 0.2g       |
| 亜硫酸ナトリウム   | 0.2g       |
| 滅菌精製水      | 全 100ml    |

(実施例6) 眼軟膏剤

下記成分を常法により混和して眼軟膏剤を製する。

|        |      |
|--------|------|
| AB-7   | 0.5g |
| 白色ワセリン | 100g |

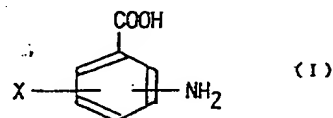
〔産業上の利用可能性〕

一般式(1)で示される化合物又はその医薬として許容し得る塩は、メイラード反応におけるタンパク質分子間架橋形成の直接の原因物質たるアマドリ転移生成物の生成自体を阻害するので、種々の糖尿病合併症、例えば冠動脈性疾患、末梢循環障害、脳血管

障害、神経症、腎症、動脈硬化、関脈硬化症、白内障及び網膜症又は老化により引き起こされる同様の疾患例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性疾患、脳血管障害、老人性白内障等の治療又は予防に用いられる。

請求の範囲

1. 次の式



〔式中、Xはヒドロキシル基又はニトロ基を表す。〕で示される物質若しくはその医薬として許容し得るエステルを、又は該物質若しくは該エステルの医薬として許容し得る塩を、含有することを特徴とするメイラード反応阻害剤。

2. 式(1)で示される物質が5-ヒドロキシアントラニル酸である請求の範囲第1項記載のメイラード反応阻害剤。

3. 式(1)で示される物質が3-ヒドロキシアントラニル酸である請求の範囲第1項記載のメイラード反応阻害剤。

4. 式(1)で示される物質が4-ニトロアントラニル酸である請求の範囲第1項記載のメイラード反応阻害剤。

5. 式(1)で示される物質が5-アミノサリチル酸である請求の範囲第1項記載のメイラード反応阻害剤。

6. 式(1)で示される物質が4-アミノサリチル酸である請求の範囲第1項記載のメイラード反応阻害剤。

7. 式(1)で示される物質が3-アミノサリチル酸である請求の範囲第1項記載のメイラード反応阻害剤。

8. 式(1)で示される物質が3-アミノ-4-ヒドロキシアニソ酸である請求の範囲第1項記載のメイラード反応阻害剤。

EXPT/ISA/210(第2卷) (1971年10月)